

Функциональные полиморфизмы генов дофамин-бета-гидроксилазы и катехол-орто-метилтрансферазы у подростков с отягощённой наркологическими заболеваниями наследственностью*

НИКОЛАЕВА В.В. к.м.н., старший научный сотрудник
ВАСЕЧКИН В.Б. к.м.н., старший научный сотрудник
АНОХИНА И.П. д.м.н., профессор, академик РАМН, зам. директора Национального научного центра наркологии
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научный центр наркологии»
Министерства здравоохранения и социального развития РФ,
119002, Москва, Малый Могильцевский пер., д.3, тел.: 8-499-241-06-03, факс: 8-499-241-09-81, e-mail: nrca@mail.ru

Проведено исследование распределения аллельных вариантов генов по однонуклеотидным полиморфизмам генов дофамин-бета-гидроксилазы (ДБГ) 444 G/A, 1021 C/T, катехол-орто-метилтрансферазы (КОМТ) Val/Met G/A в группах здоровых подростков и подростков с отягощённой наркологической патологией наследственностью, имеющих выраженные эмоциональные и поведенческие нарушения, аддиктивную патологию. Обнаружено увеличение носителей низкоактивных вариантов генов ДБГ и КОМТ в группе подростков с отягощённой наследственностью. Полученные результаты, по-видимому, указывают на вовлечённость генов данных ферментов в механизмы наследования предрасположенности к наркологической патологии, а также в механизмы формирования нарушений поведения и эмоциональной сферы у подростков с семейным анамнезом, отягощённым наркологической патологией.

Ключевые слова: гены, катехоламинерная система, дофамин-бета-гидроксилаза, катехол-орто-метилтрансфераза

Введение

Прошедшие десятилетия характеризуются ухудшением ситуации в стране в отношении потребления психоактивных веществ (ПАВ) населением. Хроническое потребление алкоголя и наркотиков приводит к тяжёлым медицинским и социальным последствиям. Известно, что у детей, родившихся от родителей, злоупотребляющих ПАВ, существенно повышается риск развития болезней зависимости. Показано также, что для них характерны повышенная возбудимость, агрессивность, склонность к риску, развитие депрессивных состояний. В экспериментах на животных, проведённых за последние годы в лаборатории психофармакологии НИЦ наркологии (руководитель — академик РАМН И.П. Анохина), показано, что потомки алкоголизированных родителей имеют значительные изменения в организации и функционировании катехоламинерной, главным образом дофаминовой, системы, которые могут играть определённую роль в механизмах индивидуального отношения к алкоголю и, возможно, являются одним из основных путей реализации влияния алкоголизма родителей на возникновение алкогольной

зависимости и особенностей поведения их потомков. Наследственная информация передаётся посредством ДНК от родителей к детям. Поэтому изучение структуры генов у людей, имеющих отягощённую наркологической патологией наследственность, может пролить свет на механизмы наследования особенностей катехоламинерной системы, приводящих к развитию болезней зависимости и нарушениям поведения и эмоций. Ферменты и рецепторы катехоламинерной системы кодируются соответствующими генами, изменения в которых могут приводить к изменению функции кодируемых ими продуктов. Как показали результаты проекта «Геном человека», основными различиями между геномами различных людей являются однонуклеотидные замены, или однонуклеотидные полиморфизмы, в цепи ДНК. Некоторые из однонуклеотидных замен являются функциональными, т.е. замена одного нуклеотида на другой приводит к функциональному изменению белка, кодируемого геном.

Целью данного исследования было изучение однонуклеотидных замен в генах, контролирующих основные ферменты катехоламинерной нейромедиаторной системы. Для изучения были выбраны следующие гены и ОНП в них: ген ДБГ — фермента, катализирующего

* Данное исследование поддержано грантом РФНФ №11-06-006-19а

превращение норадреналина в дофамин (rs1108580 ДБГ 444 G/A, rs1611115 ДБГ 1021 C/T), ген КОМТ — фермента, катаболизирующего моноамины (rs4680 КОМТ Val/Met G/A). Ранее было показано, что замена цитозина (C) на тимин (T) в положении 1021 (1021C/T) гена ДБГ приводит к существенному снижению активности фермента. Предполагается, что однонуклеотидная замена цитозина на тимин C/T в регулирующей части гена приводит к изменениям процесса транскрипции гена ДБГ и как следствие — снижению синтеза фермента. Вклад этого полиморфизма в определение активности фермента в плазме крови оценивают в 35—52% [7]. Замена гуанина (G) на аденин (A) в положении 444 экзона 2 гена ДБГ (444 G/A) также приводит к снижению активности данного фермента [4]. Замена аминокислоты валина (Val) на метионин (Met) в белке КОМТ, вызванная заменой G на A в положении 158 гена (Val/Met G/A), приводит к снижению активности фермента КОМТ в 3—4 раза [5].

Объект и методы исследования

В исследовании приняли участие 52 подростка в возрасте 10—17 лет, имеющие отягощённую наркологическими заболеваниями наследственность со стороны матери и/или отца (исследуемая группа) и 67 здоровых подростков, учащихся колледжа, не имеющих наследственной отягощённости по данной патологии (контрольная группа). Параллельно с генетическими исследованиями было проведено комплексное нейropsychологическое обследование подростков с использованием соответствующих опросников и шкал. Для подростков с отягощённой наследственностью из исследуемой группы были характерны повышенная возбудимость, делинквентное поведение, сни-

женный интерес к учёбе, вербальная агрессия, аддитивное поведение, вовлечённость в асоциальные компании, дромоманические побег, эмансипационные побег и т.д.

Выделение ДНК для генотипирования было произведено из клеток буккального эпителия с применением наборов фирмы Macherey-Nagel Tissue в соответствии с протоколом производителя. Генотипирование по вышеуказанным однонуклеотидным заменам проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в «реальном времени» с использованием праймеров и флуоресцентно-меченых зондов (табл. 1) производства российской компании «ДНК-Синтез» на амплификаторе фирмы Biorad модель IQ5.

Протокол амплификации: ДНК (10 нг/мкл) 10 мкл, 10x буфер для TaqPol 2,5 мкл, (F+R) праймеры (10 мкМ) 2 мкл, зонд FAM (10 мкМ) 1 мкл, зонд VIC (10 мкМ) 1 мкл, смесь dNTPs (5 мМ) 1 мкл, TaqPol (5 ед/мкл) 0,5 мкл, деионизованная вода до 25 мкл. Программа проведения ПЦР в «реальном времени»: 1 цикл 95°C — 3 мин, 40 циклов: 95°C — 20 с, 57°C — 1 мин (измерение флуоресценции), 72°C — 40 с. Полученные данные были обработаны посредством программ Biostat и Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

При исследовании распределения аллельных вариантов гена ДБГ по полиморфизму 444 G/A статистических различий между исследуемой группой подростков с отягощённой наркологическими заболеваниями наследственностью и контрольной группой здоровых подростков найдено не было. При исследовании распределения аллельных вариантов гена ДБГ

Таблица 1

Праймеры и зонды, использованные для генотипирования

Полиморфизм	Праймеры	Зонды
rs1108580 ДБГ 444 G/A	F=CCTTTGGCACCTGCGAC R=CATGATACACGCAGCCCA	A=FAM-TACCTCATTGAAGTAAGGG-BHQ2 G=VIC-TACCTCATTGAGGTAAGGG-BHQ2
rs1611115 ДБГ 1021 C/T	F=GGGATCAAGCAGAATGTCCTGAAG R=GGCACCTCTCCCTCCTGT	T=VIC-CCTCTCCCACAAGTAG-BHQ2 C=FAM-CTCTCCCAGCAAGTAG-BHQ2
rs4680 КОМТ Val/Met G/A	F=CCCAGCGGATGGTGGAT R=CAGGCATGCACACCTTGTC	G=FAM-TCGCTGGCGTGAAG-BHQ2 A=VIC-TTCGCTGGCATGAAG-BHQ2

Таблица 2

Распределение аллельных вариантов гена ДБГ по полиморфизму 1021 C/T

ДБГ 1021 C/T	C/C генотип	C/T генотип	T/T генотип
Исследуемая группа, n=52	21 чел. 0,4	25 чел. 0,48	6 чел. 0,12
Контрольная группа, n=67	40 чел. 0,6	18 чел. 0,27	9 чел. 0,13

по полиморфизму 1021 С/Т были получены данные, приведённые в табл. 2.

Как следует из данных, представленных в табл. 2, в группе подростков с отягощённой наркологическими заболеваниями наследственностью (исследуемая группа) статистически достоверно увеличено количество гетерозиготных С/Т-генотипов по полиморфизму 1021 С/Т гена ДБГ, связанных со сниженной активностью фермента ДБГ ($\chi^2=5,86$, $df=2$, $p=0,043$) по сравнению с контрольной группой.

При исследовании распределения аллельных вариантов гена КОМТ Val/Met G/A также были обнаружены различия между исследуемой и контрольной группами. В исследуемой группе увеличена доля носителей низкоактивного А-аллеля гена КОМТ по полиморфизму Val/Met G/A (носители генотипов G/A и A/A) $\chi^2=4,98$ $df=2$, $p=0,083$.

Таким образом, в исследуемой группе подростков с отягощённой наркологическими заболеваниями наследственностью, имеющих выраженные нарушения поведения и эмоциональной сферы, обнаружено увеличение низкоактивных вариантов генотипов генов ДБГ и КОМТ. ДБГ — это фермент, катализирующий реакцию превращения дофамина в норадреналин путём гидроксирования в β -положении. Многочисленными исследованиями, проведёнными различными авторами, было показано, что низкая активность процесса β -гидроксирования дофамина связана с развитием психопатологических состояний, а также низкой устойчивостью к стрессу [2]. Так, по мнению G.A. Rogeness [6], функционирование норадренергической системы головного мозга снижено при расстройствах поведения асоциальной направленности. Такие люди отличаются асоциальным поведением, они менее чувствительны к опасности, риску, общественному порицанию, у них отсутствуют проявления тревожности, они склонны к делинквентному поведению и преодолению социально установленных правил поведения. G.A. Rogeness с соавторами показали, что в группе детей с низкой активностью ДБГ выше процент расстройств поведения. В ранее проведённом нами исследовании [1] было установлено, что частота генотипа 1021 С/Т гена ДБГ выше в группе больных алкогольной зависимостью по сравнению со здоровыми людьми. Полученные в настоящем исследовании

результаты показывают, что увеличение С/Т варианта генотипа гена ДБГ, связанного с её сниженной активностью, наблюдается именно в группе подростков, имеющих выраженные нарушения поведения и аддиктивную патологию.

Фермент КОМТ метаболизирует катехоламины путём о-метилирования. Основной функцией данного фермента является элиминация биологически активных катехоламинов. Многочисленными исследованиями показано, что полиморфизм в активности КОМТ имеет, по-видимому, клиническое значение, хотя данные генетических исследований разноречивы. Так, например, была установлена ассоциация низкоактивной КОМТ с агрессивным и антисоциальным вариантом шизофрении [5]. Лонгитудинальное исследование группы подростков [5] с микроделецией участка хромосомы 22 — 22q11.2 делеционный синдром (синдром Ди Джорджа, или велофациокардиальный синдром) — выявило наличие низкоактивного аллеля КОМТ (гемизиготы КОМТ -L) в качестве фактора риска значительного снижения объёма префронтальной коры и развития тяжёлой психотической симптоматики в юношеском возрасте по сравнению с высокоактивным вариантом КОМТ. Так как индивидуумы с этим синдромом несут только одну копию низкоактивного аллеля КОМТ, возможно, они подвергаются воздействию необычайно высокой концентрации дофамина в мозге на протяжении длительного периода. Показано также, что мыши с отсутствием гена КОМТ характеризуются высоким уровнем дофамина, особенно в области префронтальной коры, и аберрантным поведением [3].

Заключение

Было проведено исследование распределения аллельных вариантов генов по однонуклеотидным полиморфизмам генов ДБГ 444 G/A, 1021 С/Т, КОМТ Val/Met G/A в группах здоровых подростков и подростков с отягощённой наркологической патологией наследственностью, имеющих выраженные эмоциональные и поведенческие нарушения, а также аддиктивную патологию.

Обнаруженное нами в настоящем исследовании увеличение низкоактивных вариантов генотипов генов ДБГ и КОМТ в группе подростков с наследственно-

Таблица 3

Распределение аллельных вариантов гена КОМТ по полиморфизму Val/Met G/A

КОМТ Val/Met G/A	G/G генотип	G/A генотип	A/A генотип
Исследуемая группа, n=52	8 чел. 0,15	30 чел. 0,57	14 чел. 0,28
Контрольная группа, n=67	17 чел. 0,25	25 чел. 0,37	25 чел. 0,38

стью, отягощённой наркологической патологией, имеющих выраженные нарушения поведения и эмоциональной сферы, свидетельствует, по всей вероятности, о вовлечённости данных низкоактивных вариантов генов, контролирующих катехоламиную нейромедиацию, в механизмы наследования предрасположенности к наркологической патологии, а также нарушений поведения и эмоциональной сферы у подростков с отягощённой наркологической патологией наследственностью.

Список литературы

1. Анохина И.П., Николаева В.В., Чоговадзе А.Г., Генерозов Э.В., Веретинская А.Г., Агibalова Т.В., Умарова Е.Р., Шамакина И.Ю. Структурные особенности гена дофамин-бета-гидроксилазы у больных алкоголизмом // Вопросы наркологии. — 2008. — №2. — С. 31—40.
2. Мезенцева Л.Н. Роль индивидуальных особенностей обмена биогенных аминов в устойчивости к развитию патологических последствий стресса: Автореф. дисс. на соискание учёной степени к.биол.н. — М., 1982. — С. 15.

3. Gogos J.A., Morgan M., Luine V., Santha M., Ogawa S., Pfaff D., Karayiorgou M. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — Vol. 95. — P. 9991—9996.

4. Kobayashi K., Kurosawa Y., Fujita K., Nagatsu T. Human dopamine beta-hydroxylase gene: two mRNA types having different 3'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation // *Nucl. Acid. Res.* — 1989. — Vol. 17. — P. 1089—1102.

5. Lachman H.M., Papolos D.F., Saito T., Yu Y.M., Szumlanski C.L., Weinshilboum R.M. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders // *Pharmacogenetics.* — 1996. — Vol. 6. — P. 243—250.

6. Rogeness G.A., Javors M.A., Maas J.W., Macedo C.A. Catecholamines and diagnoses in children // *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* — 1990. — Vol. 29. — P. 234—241.

7. Zabetian C.P., Anderson G.M., Buxbaum S.G., Elston R.C., Ichinose H., Nagatsu T., Kim K.S., Kim C.-H., Malison R.T., Gelernter J., Cubells J.F. A quantitative trait locus analysis of human dopamine β -hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 68. — P. 515—522.

FUNCTIONAL POLYMORPHISMS OF DOPAMINE-BETA-HYDROXYLASE AND CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE GENES IN ADOLESCENTS WITH SUBSTANCE ABUSE FAMILY HISTORY

NIKOLAEVA V.V., VASECHKIN V.B., ANOKHINA I.P.

National Addiction Research Center of the Ministry of Health and Human Development, Russian Federation
119002, Moscow, Maly Mogiltsevsky lane, 3, tel.: 8-499-241-06-03, fax: 8-499-241-09-81, e-mail: nrca@mail.ru

The study of allelic variants of dopamine-beta-hydroxylase (DBH) (444 G / A, 1021 C / T) and catechol-o-methyltransferase (COMT) (Val / Met G / A) genes in healthy adolescents and adolescents with substance abuse family history, emotional, behavioral and addictive disorders was performed. An increase in low-level enzyme activity gene variants of dopamine-beta-hydroxylase and catechol-o-methyltransferase in adolescents with substance abuse family history was revealed. This apparently indicates the involvement of DBH and COMT low-level enzyme activity gene variants in mechanisms of inheritance of susceptibility to drug abuse, behavioral and emotional disorders in adolescents with substance abuse family history.